

李永俊,赵希子,郭相和,等. 马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的 RT-PCR 检测[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):26-27.

马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)的 RT-PCR 检测

李永俊¹, 赵希子¹, 郭相和¹, 全英姬¹, 李平¹, 金松爱²

(1. 延边职业技术学院, 吉林延吉 133001; 2. 吉林省敦化市农业技术推广中心, 吉林敦化 133700)

摘要:以马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)检测试剂盒提取的 2 种不同材料的 mRNA 为模板,进行 cDNA 合成及 PCR 扩增,从感病组织中扩增得到一段长 360 bp 的特异 PCR 扩增产物,而健康的试管苗中则无此扩增产物。以感染 PSTVd 的马铃薯试管苗、块茎和健康的马铃薯试管苗、块茎为材料,用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的 PSTVd 检测试剂盒提取试管苗、块茎这 2 种不同材料中的 mRNA。结果表明,试剂法可对马铃薯不同材料进行 PSTVd 检测,60 min 内即可分离出 mRNA,整个诊断时间为 4 h,方法简便、快捷、灵敏度高,因此可以作为马铃薯种薯生产早期 PSTVd 诊断及品种引进的快速、有效的检测手段。

关键词:马铃薯纺锤块茎类病毒;RT-PCR;mRNA

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0026-02

马铃薯纺锤块茎病害是由类病毒引起的,是危害我国北方马铃薯生产和实生种子品质的重大病害。据报道,马铃薯纺锤块茎类病毒(PSTVd)强系减产可达 60%,弱系减产约 20%~35%,常常因此造成较大的经济损失^[1]。马铃薯类病毒是马铃薯种薯检疫规程中的主要检疫对象,具有广泛的传播途径,是唯一不能通过茎尖剥离、组织培养而汰除的病毒,必须通过严格的检测而将其汰除。据报道,控制 PSTVd 传染的有效方法仅有依赖于 PSTVd 的早期鉴定^[2]。目前主要采用指示植物、聚丙烯酰胺凝胶电泳技术、核酸斑点杂交技术等方法进行检测。随着 PCR 技术的产生,RT-PCR 技术已经被越来越广泛地应用在 RNA 病原的鉴定上,应用 RT-PCR 技术检测植物病原具有快速、灵敏、简便、特异性强等优点,而且可以检测出植物组织中含有量极低的病毒 RNA^[3-4]。本研

究使用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的 PSTVd 检测试剂盒,旨在通过试验说明使用该试剂盒提取植物 mRNA 具有方法简便、省时、灵敏度高等优点,而且可以对不同的马铃薯材料进行检测,检测结果准确可靠、重复性好。

1 材料与方法

1.1 试验材料

感染 PSTVd 的马铃薯试管苗、块茎由俄罗斯哈巴农业科学研究院马铃薯研究所提供;健康的马铃薯试管苗、块茎由延边农业科学研究院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 植物 mRNA 的提取 以感染 PSTVd 的马铃薯试管苗、块茎和健康的马铃薯试管苗、块茎为试验材料,采用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的植物病原 RNA 提取试剂盒,该试剂盒中包含的 mRNA 提取操作步骤在以下简称为“试剂法”。具体操作过程为:称取 100 mg 样品放入 1.5 mL 离心管中,加入 100 μ L Pre-Buffer 将样品捣碎;然后加入

收稿日期:2013-02-23

作者简介:李永俊(1959—),男,吉林和龙人,副教授,研究方向为马铃薯脱毒、病毒检测、新品种选育。E-mail:leelkc@163.com.

合为 6-BA 1.0 mg/L + 2,4-D 0.1 mg/L,添加 3% 蔗糖有利于促进愈伤组织的形成,愈伤组织诱导率可达到 76.8%。蔗糖浓度为 2% 时,培养基营养偏少,不能满足植物细胞生长的需要蔗糖,浓度达到 4% 时,虽然营养增加了,但培养基的渗透压也随着增加了,也不利于植物细胞对养分的吸收,从而影响其生长。

试验结果表明,完全黑暗条件不利于愈伤组织的形成,适宜的光照条件能刺激叶片细胞脱分化,加快愈伤组织的形成,最适宜的光强为 1 000 lx 左右,光线过强,不利于红掌的愈伤组织形成,这与岑益群等、陈华林等的结果^[7-8]相同,而与王进茂等的结果^[9]相反,所以对于红掌组培中适宜的光照条件,还有待于进一步研究与探索。

参考文献:

[1] 兰芹英,李启任,何惠英,等. 红掌愈伤组织诱导和芽的分化[J]. 园艺学报,2003,30(1):107-109.

[2] 夏时云,麦瑜玲,许继勇,等. 提高红掌叶片愈伤组织诱导和植株分化及壮苗率的技术研究[J]. 中国农学通报,2005,21(2):45-48.

[3] 潘学峰,潘梅,洪世军. 红掌叶片愈伤组织的诱导与植株再生[J]. 海南大学学报:自然科学版,2000,18(2):144-149.

[4] 朱饱卿,柴向华,李军,等. 红掌的花序培养及快速繁殖技术的研究[J]. 中国农学通报,2004,20(4):223-224.

[5] 王桂兰,陈超,李朝霞,等. 红掌气生根根段再生快繁体系的建立[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):297-301.

[6] 刘振祥,廖旭辉. 植物组织培养[M]. 北京:化学工业出版社,2007:85-87.

[7] 岑益群,蒋如敏,邓志龙. 安祖花增殖的形态与理化因子效应[J]. 园艺学报,1993,20(2):187-192.

[8] 陈华林. 不同培养条件和外植体处理对红掌品种组培效果的影响[J]. 西南园艺,2003,31(4):35-37.

[9] 王进茂,郑均宝,高秀丽,等. 花烛组织培养的研究[J]. 河北林果研究,2000,15(1):69-74.

1 mL Lysis Buffer 涡旋 10 s, 静置 3~5 min; 加入 200 μ L 氯仿, 涡旋 10 s, 静置 3~5 min; 于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 的条件下离心 10 min, 取 400 μ L 含 RNA 的上清液加入到新的离心管中(小心抽提, 不能取到中间层的白色膜状物或下层的苯酚); 加入 400 μ L Binding Buffer(与抽取的上清液等量), 混合均匀; 将试剂盒中装有纤维素的无底离心管置于普通无盖离心管内, 在 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 条件下离心 30 s, 脱掉离心管中液体, 使管内形成纤维素柱; 将无底离心管插在自制的真空泵连接器上, 将上述提取的含总 RNA 的溶液移入无底离心管内后, 启动真空泵, 用 Washing Buffer 重复洗涤 7 次; 取下无底离心管, 放入普通无盖离心管中, 加入 50 μ L Elution Buffer, 静置 1 min 后于 4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 条件下离心 1 min。

1.2.2 PSTVd 的特异性引物 PSTVd 的特异引物由韩国 INTRON 生物化学制药公司合成并生产成试剂盒, 每个试剂盒中装有 96 个 PCR 管, 管内盛有已混合好的 2 种特异性引物 (PSTVdF/PSTVdR) 以及 PCR 扩增过程中所需的反应物。

1.2.3 cDNA 的合成及 PCR 扩增 使用该试剂盒只需在 PCR 管中加入 20 μ L 提取的 mRNA 即可。cDNA 合成及 PCR 扩增可在同一 PCR 管中进行。PCR 扩增在 20 μ L 反应体系中进行。在 cDNA 的合成过程中, 先以 RNA 为模板, 在引物 PSTVdF 的引导下, 合成 PSTVd 的 cDNA 第 1 链, 整个反应程序包括 RT 和扩增, 反应条件为: 45 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物的检测: 取 5 μ L 扩增产物, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 用终浓度 0.5 μ L/mL 的溴化乙锭染色。电极缓冲液为 TBE 缓冲液, 在电压 100 V 的条件下电泳 40 min 左右即可在紫外分析仪下观察结果、照相。

2 结果与分析

以提取的 mRNA 为模板, 经 RT-PCR 扩增后, 用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 在紫外分析仪下观察, 结果见图 1。从图 1 可以看出, 感病试管苗和块茎在 360 bp 处出现明显的扩增条带。此外还可以看出, 用试剂法提取的试管苗 mRNA, RT-PCR 扩增、电泳后观察的结果略好于提取的块茎 mRNA 的 RT-PCR 扩增结果; 以未感病试管苗的 RT-PCR 扩增产物为对照, 未得到任何条带。

3 讨论

本研究采用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的植物病原 RNA 提取试剂盒直接提取感病植物 mRNA, 与传统的先提纯病毒粒子、再酶解植物病毒外壳蛋白而获得 RNA 的方法相比^[5], 具有快速简单、灵敏有效的优点。

在用试剂法提 RNA 时, 能有效除去样品中蛋白质、酚、小

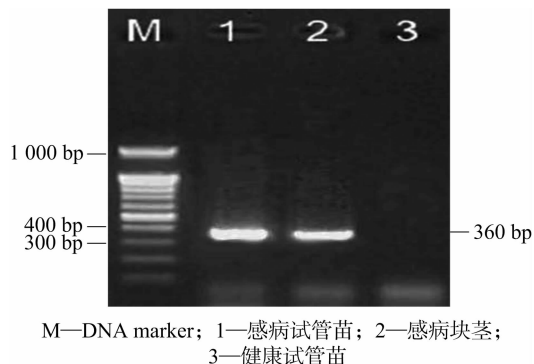


图1 PSTVd的RT-PCR检测结果

分子及盐等物质, 从而保证了 RNA 的生物学活性。而且能有效地防止酚类化合物的氧化, 可以特异性地沉淀出核酸中的 mRNA, 从而保证了类病毒 mRNA 的纯度和完整性。以淀粉含量高的块茎为试验材料时, 用常规方法是很难提取出 RNA 的, 而试剂法能有效除去淀粉和其他杂质, 得到纯度高和完整性好的 mRNA。此外, 试剂法的整个提取过程可在 60 min 内完成, 减少了提取过程中 mRNA 的降解, 提高了反应的准确性。

在 RT 过程中, 一般的方法是从一个方向合成 cDNA, 而试剂法是从 2 个方向合成 cDNA, 因此能够缩短检测时间, 提高效率。

PSTVd 分强系和弱系, 用常规方法常常不能有效地检测出弱系。而试剂法对少量样品也可准确检测出结果。目前文献中关于马铃薯病毒及类病毒的 RT-PCR 检测方法较多, 但同一个植物的不同材料中病毒的含量往往不同。本研究使用韩国 INTRON 生物化学制药公司生产的 PSTVd 检测试剂盒进行试验, 发现该检测试剂盒的提取方法简单、有效、灵敏度高、检测结果可靠, 而且省时省力, 对马铃薯种薯生产早期的类病毒诊断具有重要意义和应用价值。

参考文献:

- [1] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1990: 284.
- [2] 温喜金, 石俊堂, 赵国琦. 乌盟马铃薯纺锤块茎类病毒的侵染状况及防治途径[C]//陈伊里. 中国马铃薯研究进展. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 1999: 300-302.
- [3] 黎园, 吴竹妍, 孙洁, 等. 2 种兰花主要病毒双重一步法 RT-PCR 检测的影响因素[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1205-1206.
- [4] 朱水芳, 相宁, 张成良, 等. PCR 和 Dig-cRNA 探针检测番茄环斑病毒[J]. 中国进出境动植检, 1995(4): 29-31.
- [5] 吴志明, 朱水芳, 张成良, 等. 应用 RT-PCR 法快速检测马铃薯卷叶病毒[J]. 河北农业大学学报, 2000, 23(4): 77-99.